

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas

Francine Bretanha Ribeiro de Souza

Pelotas, 2014.

FRANCINE BRETANHA RIBEIRO DE SOUZA

Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Gilberto D'Ávila Vargas

Co-orientador: Geferson Fischer

Pelotas, 2014.

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S719a Souza, Francine Bretanha Ribeiro de

Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas / Francine Bretanha Ribeiro de Souza. – 51f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Veterinária Preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Gilberto D'Ávila Vargas; co-orientador Geferson Fischer.

1.Veterinária. 2.Própolis. 3.Antimicrobiana.
4.Desinfetante.5.Amônia quartenária. I.Vargas, Gilberto D'àvila. II. Fischer, Geferson. III. Título.

CDD: 636.5

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas

Prof. Dr. Geferson Fischer

Prof. Dr. Roberto de Andrade Bordin

Dra. Sílvia Regina Leal Ladeira

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Deus, pela vida e por permitir que encontrasse pessoas maravilhosas em meu caminho.

Aos meus pais, meus amores, Janice e Ruymar, pelo amor, apoio e dedicação. Obrigada pelos esforços para a realização de meus sonhos.

À minha irmã, Ana Carolina, pelo companheirismo e amizade. Miguel que, mesmo longe, poderá contar sempre comigo. Ao meu afilhado Pedro, por tornar cada sorriso um incentivo.

“Irmã” Lucimar e “sobrinho” Lucas, família de coração, obrigada por participarem da minha vida.

Avós, avôs, tios, tias, primos e primas, obrigada por tudo.

Meu grande amigo e amor, Fabio, obrigada pela amizade, amor, apoio e companheirismo. Agradeço sua presença em minha vida!

Ao professor orientador Gilberto D'Ávila Vargas pela orientação, disponibilidade e paciência. Ao professor co-orientador Geferson Fischer pela ajuda sempre que necessária.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, principalmente a colega Raulene Rodrigues Lobo pela incansável ajuda e disponibilidade para realização do trabalho. À querida Márcia Rodrigues pelo carinho.

Ao Prof. Marcos Ancuti pela disponibilidade e empenho para realização do experimento.

Às colegas Sívila Ladeira e Luiza Osório pela contribuição e orientação.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”
Paulo Freire

Resumo

SOUZA, Francine Bretanha Ribeiro de. **Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas.** 2014. 51f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O uso de produtos naturais com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. A própolis é uma substância resinosa natural, produzida por abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, que vem sendo utilizada desde a antiguidade na medicina popular, tanto humana quanto veterinária, devido as suas propriedades terapêuticas. A atividade antimicrobiana é relatada em diversos estudos que utilizam como modelo experimental diferentes gêneros de vírus, bactérias, fungos e parasitas, porém são raros os estudos utilizando-a como desinfetante. Avaliou-se um extrato etanólico de própolis verde (EPPV), em comparação com um desinfetante comercial à base de amônia quaternária, quanto à capacidade desinfetante *in situ* em bebedouros utilizados para frangos de corte até 28 dias de idade das aves. O EPPV também foi avaliado, *in vitro*, contra as bactérias isoladas a partir de suabes dos bebedouros utilizados no experimento. Aos 28 dias de idade dos frangos, quando o desafio microbiano foi maior, a ação do EPPV como desinfetante foi semelhante à ação do desinfetante comercial a base de amônia quaternária. Nesta mesma idade das aves, o EPPV, assim como o desinfetante comercial, inibiu por completo o crescimento fúngico nos bebedouros. O EPPV apresentou ação *in vitro* contra as bactérias gram positivas *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., isoladas a partir de suabe coletado dos bebedouros, além da bactéria gram negativa *Escherichia coli*.

Palavras-chave: Própolis. Antimicrobiana. Desinfetante. Amônia quaternária.

Abstract

SOUZA, Francine Bretanha Ribeiro de. **Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas.** 2014. 51f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The use of natural products for medicinal purposes for treatment, cure and prevention of diseases is one of the most antique forms of medical practice of humanity. Propolis is a natural resinous substance produced by honeybees from exudates collected of different parts of the plant and has been used as a therapeutic compound since antiquity in the popular medicine both human and veterinary due to its therapeutics properties. The antimicrobial activity is mentioned in various studies applying different genus of viruses, fungus, bacterias and parasites as a experimental model. An ethanolic extract from green propolis was evaluated as to the sanitizer capacity in situ over drinking fountains used for broilers in comparison with a commercial disinfectant based on quaternary ammonia. The extract was also evaluated in vitro against bacterias isolated from the drinking fountains used in the experiment. At 28 days of broiler age when the microbial challenge was greater the action of the extract as a disinfectant was similar to the action of the commercial disinfectant based on quaternary ammonium. In the same age of the birds both the propolis extract as well as the commercial disinfectant the fungal growth was completely inhibited in the drinking fountains. The extract presented action in vitro against gram positive bacteria *Staphylococcus* sp. negative coagulase, *S. aureus*, *Corynebacterium* sp. isolated from swabs collected from the drinking fountains and also the gram negative bacteria *Escherichia coli*.

Key-words: Propolis. Antimicrobial. Disinfectant. Quaternary ammonium.

Lista de figuras

Figura 1: Representação gráfica da contagem geral, por coleta, de UFC/ml. (a) Contagem de mesófilos totais. (b) Contagem de bolores totais. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre coletas ($p < 0,05$).35

Figura 2: Representação gráfica do número de UFC/ml de mesófilos totais em cada coleta sendo AA: T1 antes aplicação do tratamento - água, AD: T1 depois aplicação do tratamento - água, PA: T2 antes aplicação do tratamento - EEPV, PD: T2 depois aplicação do tratamento - EEPV, DA: T3 antes aplicação do tratamento – amônia quaternária, DD: T3 depois aplicação do tratamento – amônia quaternária. (a) Coleta 1, (b) Coleta 2, (c) Coleta 3, (d) Coleta 4, (e) Coleta 5. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.37

Figura 3: Representação gráfica do número de UFC/ml de bolores totais em cada coleta sendo AA: T1 antes aplicação do tratamento - água, AD: T1 depois aplicação do tratamento - água, PA: T2 antes aplicação do tratamento - EEPV, PD: T2 depois aplicação do tratamento - EEPV, DA: T3 antes aplicação do tratamento – amônia quaternária, DD: T3 depois aplicação do tratamento – amônia quaternária. (a) Coleta 1, (b) Coleta 2, (c) Coleta 3, (d) Coleta 4, (e) Coleta 5. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.39

Sumário

1 Introdução	10
2 Artigos	12
2.1 Artigo 1	12
RESUMO	13
INTRODUÇÃO	14
ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	15
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	17
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	21
ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	22
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	24
2.2 Artigo 2	27
RESUMO	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
3 Considerações finais	47
4 Referências	48
5 Apêndices.....	51

1 Introdução

O uso de produtos naturais para tratamento e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005). As plantas brutas e os extratos destacam-se como as principais formas de sua utilização e um dos produtos naturais utilizados pela humanidade durante séculos, sob diversas formas, é a própolis (PEREIRA et al., 2002).

A própolis é uma substância resinosa, produzida por abelhas *Apis mellifera*, coletada de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudatos resinosos (PARK et al., 2002). Após a coleta, a substância é enriquecida com secreções enzimáticas e salivares (CASTALDO; CAPASSO, 2002). A composição, assim como a coloração da própolis, depende da flora da região visitada pela abelha, sendo a grande variabilidade na sua composição apresentada em diversos estudos (PARK et al., 2002; BANKOVA et al., 2000; LUSTOSA et al., 2008).

A própolis possui diversas ações bioativas, entre elas a função antimicrobiana (SFORCIN et al., 2000). Há muitos estudos demonstrando a função antimicrobiana da própolis, incluindo estudos em agentes de interesse veterinário, sejam eles virais (AMOROS et al., 1992; FISCHER et al., 2005; CUETO et al., 2011; VILELA et al., 2011), bacterianos (BANKOVA et al., 1999; SFORCIN et al., 2000; GARCIA et al., 2004; RIGHI et al., 2011) , fúngicos (SIQUEIRA et al., 2009; MONZOTE et al., 2012) e parasitários (GRESSLER et al., 2012).

A avicultura encontra-se em constante desenvolvimento, baseado principalmente em boas técnicas de manejo, melhoramento genético, nutrição e controle sanitário. Os procedimentos de limpeza e desinfecção constituem etapas importantes do ciclo de produção, pois a partir delas controla-se ou elimina-se

microorganismos indesejáveis. Para isso é necessária a utilização de produtos de eficácia comprovada. Porém, ao contrário da resistência a antibióticos, a resistência bacteriana à produtos desinfetantes é pouco compreendida, apesar de ser uma preocupação crescente (GODOY, 2001; DICKEL, 2004; RUSSEL, 1998; McDONNELL; RUSSEL, 1999).

Pelo fato de possuírem propriedades antimicrobianas comprovadas, os produtos naturais, como a própolis, representam uma opção na desinfecção de equipamentos utilizados na avicultura, porém raros são os estudos utilizando esses produtos como desinfetantes.

Neste trabalho avaliamos o efeito *in situ* de um extrato etanólico de própolis verde como desinfetante em bebedouros utilizados na avicultura, assim como o efeito *in vitro* do mesmo em bactérias isoladas a partir dos bebedouros utilizados.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário

Souza, F. B. R^{1*}, Fischer, G.¹, Vargas, G. D.¹

¹ *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

** Autor para correspondência: cinebsouza@yahoo.com.br*

**O artigo foi submetido e publicado na revista Science and Animal Health
v.1, n.1, p. 24-37, 2013 (Apêndice 1)**

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa natural, produzida por abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, que vem sendo utilizada desde a antiguidade na medicina popular, tanto humana quanto veterinária, devido as suas propriedades terapêuticas. Embora determinados mecanismos de ação não estejam totalmente esclarecidos, este produto das abelhas tem sido relacionado à ação antisséptica, cicatrizante e antipirética. A atividade antimicrobiana é relatada em diversos estudos que utilizam como modelo experimental, diferentes gêneros de vírus, bactérias, fungos e parasitas. No entanto, achados controversos em relação à atividade da própolis como agente antimicrobiano, são descritos, possivelmente devido à grande variabilidade química existente entre diferentes amostras de própolis, bem como das diferentes metodologias adotadas nos estudos científicos. Este artigo teve como objetivo revisar e discutir alguns aspectos relacionados à ação antimicrobiana da própolis sobre microrganismos de interesse veterinário.

Palavras-chave: Própolis. Antimicrobiano. Veterinária.

INTRODUÇÃO

A história do desenvolvimento das civilizações é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa (VIEGAS JR.; BOLZANI, 2006). O uso de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. Nos anos 90, foi divulgado pela OMS (Organização Mundial de Saúde), que grande parte da população dos países em desenvolvimento dependia das plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

A própolis é uma substância medicinal natural que vem sendo utilizado desde a antiguidade. Os Egípcios conheciam seus efeitos anti-putrefativos utilizando-a para embalsamar cadáveres. Os Gregos e Romanos reconheceram a própolis por suas propriedades medicinais, sendo utilizada como antisséptico e cicatrizante em feridas e desinfetantes bucais (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Este efeito cicatrizante da própolis foi utilizado durante a Segunda Guerra Mundial em diversas clínicas na União Soviética (BARBOSA et al., 2009). A própolis também era utilizada por outras civilizações, como os Incas que a utilizavam como antipirético. Entre os séculos XVII e XX a própolis se tornou popular devido à sua ação antibacteriana (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera*. Esta substância é coletada de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudatos resinosos (PARK et al., 2002). Uma vez coletada, essa substância é enriquecida com secreções enzimáticas e salivares (CASTALDO; CAPASSO, 2002). A própolis é utilizada para cobrir paredes da colméia, preencher rachaduras e brechas, embalsamar insetos invasores mortos, reparar favos e manter o interior da colméia asséptico, principalmente o local de postura da rainha (BANKOVA et al., 2000). A composição assim como a coloração da própolis depende da flora da região visitada pela abelha (PARK et al., 2002). Estudos mostram a grande variabilidade na sua composição (BANKOVA et al., 2000; LUSTOSA et al., 2008).

Mesmo sendo conhecida na medicina popular desde a antiguidade, a própolis tem atraído atenção de pesquisadores por sua utilidade na medicina e na cosmética, sendo amplamente estudada sua função antimicrobiana (SFORCIN et al., 2000). Inúmeros estudos relatando as

propriedades biológicas da própolis já foram descritos (MARCUCCI, 1995; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005).

Esta revisão tem por objetivo descrever os estudos realizados sobre a função antimicrobiana da própolis em microrganismos de interesse veterinário.

ATIVIDADE ANTIVIRAL

Em 1992, Amoros et al. avaliaram a atividade de um extrato etanólico de própolis, obtida da região de Rennes, na França, frente à alguns vírus *in vitro*, dentre eles o adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e o vírus da estomatite vesicular (VSV), que são de importância veterinária. Mesmo nas maiores concentrações do extrato etanólico de própolis testado, o CAV-2 não perdeu a infectividade. Já a infectividade do VSV foi reduzida a zero quando o vírus foi incubado por 120 minutos com o extrato etanólico de própolis na concentração de 500 µg/mL.

Cueto et al. (2011) relataram a atividade de um extrato etanólico de própolis contra o calicivirus felino (FCV), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Foram utilizados dois extratos etanólicos de própolis, um de própolis obtida da região central do estado Rio Grande do Sul (EP1), e outro adquirido de uma empresa de Minas Gerais (EP2). Três tipos de linhagens celulares foram utilizadas: MDBK (células de rim bovino), MDCK (células de rim canino) e CRFK (células de rim felino). Os extratos da própolis foram adicionados nas concentrações de 1500; 750; 375; 187,5; 93,75; 46,8; 23,4; 11,7 µg.mL⁻¹, em três períodos distintos: antes da inoculação do vírus, após a inoculação do vírus e antes e após a inoculação viral. Os melhores resultados foram obtidos quando o extrato da própolis foi adicionado antes da inoculação viral, sendo o efeito do EP1 superior ao EP2. Porém, ambos apresentaram melhor atividade contra o BVDV, do que contra o FCV e CAV-2. A análise cromatográfica dos extratos etanólicos de ambas as própolis indicou a presença de flavonóides como rutina, quercetina e ácido gálico, havendo uma maior quantidade de rutina no EP1.

Fischer et al. (2005) testaram o efeito de uma solução de própolis verde contra o herpesvírus bovino tipo 1 e o vírus da diarreia viral bovina. Foram utilizadas duas suspensões de uma

amostra de BoHV-1 e de uma amostra de BVDV, que foram incubadas com 1000 µg de própolis. O tempo de incubação foi de zero e seis horas para a suspensão 1 do BoHV-1 e BVDV, e duas e oito horas para a suspensão 2 do BoHV-1 e BVDV. Houve inativação do BoHV-1 nas duas suspensões, quando incubadas à seis e oito horas. Já com o BVDV, ao contrário de Cueto et al. (2011), não se obtiveram resultados significativos.

Vilela et al. (2011) avaliaram o efeito virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o avipoxvirus na membrana corioalantóide de ovos embrionados. Os ovos foram inoculados com diferentes concentrações da própolis (2400 µg/dose, 240 µg/dose e 24 µg/dose) e submetidos à zero, quatro ou oito horas de incubação juntamente com o vírus. Após o período de incubação, avaliaram-se as lesões causadas pelo vírus (chamadas lesões pox) e o efeito da própolis. As lesões histopatológicas reduziram-se significativamente após oito horas de incubação e o número de lesões pox também se reduziu significativamente após as incubações, havendo inclusive ausência de lesões quando incubados com 2400 µg/dose de própolis. O extrato etanólico de própolis verde utilizado neste estudo foi previamente submetido a uma análise cromatográfica indicando a presença de grandes níveis de compostos fenólicos e de ácido cinâmico e seus derivados, e os flavonóides corresponderam a 22,37% do extrato seco (FISCHER et al., 2007).

Kujumgiev et al. (1999) testaram extratos alcoólicos e voláteis de própolis provenientes de diferentes origens geográficas, sendo elas da Bulgária, Albânia, Mongólia, Egito, três regiões do Brasil (São Paulo, Ceará e Paraná) e duas regiões das Ilhas Canárias, contra o vírus da influenza aviária (H7N7). Os extratos etanólicos testados apresentaram efeito antiviral e porcentagens significativas de ácidos fenólicos e flavonóides em sua composição química, analisada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Porém os extratos de própolis provenientes do Brasil não apresentaram ou apresentaram somente traços destes constituintes, havendo uma maior porcentagem de ácidos aromáticos. No entanto apresentaram atividade semelhante aos demais extratos.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Em 1999, Bankova et al. avaliaram a atividade *in vitro*, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, de óleos essenciais de três amostras de própolis, produzidas por três espécies de abelhas diferentes: *Melipona compressites* do estado do Piauí, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides* do estado do Paraná. Pelo método de difusão verificou-se que os óleos essenciais das três amostras exerceram baixa atividade contra *S. aureus* e nenhuma atividade contra *E. coli*.

Sforcin et al. (2000) avaliaram o efeito de um extrato etanólico de própolis, coletada no estado de São Paulo, de acordo com a estação do ano em que ocorreu a coleta. Avaliou-se a ação antimicrobiana contra 15 cepas de *S. aureus*, cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, cinco de *E. coli* e cinco de *Salmonella typhymurium*. As amostras de própolis de cada estação do ano foram testadas nas concentrações que variaram de 0,4 a 14,0%. As cepas de *S. aureus* foram suscetíveis às concentrações mais baixas do extrato, obtendo-se 90% de inibição do crescimento em uma concentração de 0,6% do extrato etanólico de própolis. As bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. typhymutium*) foram mais resistentes ao extrato, havendo inibição de 90% do crescimento em concentrações acima de 5%. E não houve diferença estatística na concentração inibitória mínima dos extratos etanólicos das amostras de própolis coletadas em diferentes estações do ano.

Loguercio et al. (2006) conduziram um experimento avaliando a atividade *in vitro* de um extrato de própolis obtida da região de Santa Maria, no estado Rio Grande do Sul, em solução alcoólica a 50%, contra agentes causadores da mastite bovina, sendo testado contra 63 linhagens bacterianas: 36 de *Staphylococcus* coagulase-positivos e 27 de *Streptococcus* spp. Dentre as amostras testadas, 90,5% foram sensíveis ao extrato da própolis, sendo o efeito contra os isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos superior aos de *Streptococcus* spp. (94,4% contra 85,2%, respectivamente).

Garcia et al. (2004), testaram o efeito *in vitro* e *in vivo* de um extrato alcoólico da própolis (EAP) sobre *Pasteurella multocida*, isolada de coelhos. A própolis foi obtida de três regiões diferentes do estado de São Paulo. No ensaio *in vitro*, o extrato alcoólico de própolis foi

adicionado ao meio de cultura em três concentrações (5, 10 e 15%). Após a inoculação da *P. multocida* nas placas contendo meio e EAP, essas foram incubadas e observadas com intervalos de 24 h para avaliação de crescimento microbiano. Como controle, utilizou-se as mesmas concentrações de álcool etílico PA. No grupo controle, somente se observou inibição parcial do crescimento bacteriano com a adição de 15% de álcool etílico PA no meio de cultura. Já as placas que receberam as diferentes concentrações do EAP apresentaram inibição total do crescimento bacteriano desde a primeira leitura (24 h), com exceção da primeira leitura nas placas com 5% de própolis proveniente de uma das regiões. O ensaio *in vivo* foi realizado a partir da adição de diferentes concentrações do extrato seco de própolis (0,1%, 0,2% e 0,3%) na ração fornecida aos animais, sendo que o grupo controle recebeu ração pura. Observou-se o número de unidades formadoras de colônia (UFC) na região traqueobrônquica dos coelhos, antes e após o fornecimento das rações. Obteve-se redução significativa no número de UFC nas rações que continham 0,1 e 0,2% de extrato seco de própolis.

Vargas et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana *in vitro* da própolis, obtida de apiários comerciais da região de Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul, em solução alcoólica a 50% sobre 161 isolados bacterianos, 81 Gram-positivos (46 de *Staphylococcus* spp., 21 de *Streptococcus* spp., cinco de *Rhodococcus equi* e nove de *Nocardia asteroides*) e 80 Gram-negativos (29 de *Pseudomonas aeruginosa*, nove de *Proteus mirabilis*, 22 de *Salmonella* spp. e 20 de *E. coli*). Do total de amostras analisadas, 109 foram sensíveis ao extrato de própolis, sendo 75 Gram-positivas e 34 Gram-negativas. Dentre as amostras Gram-positivas, a *N. asteroides* apresentou 100% de sensibilidade, seguida por *Staphylococcus* spp. (97,83%), *Streptococcus* spp. (80,95%) e *R. equi* (80%). As bactérias Gram-negativas testadas mostraram-se mais resistentes ao extrato de própolis do que as Gram-positivas. *P. aeruginosa* foi a Gram-negativa que apresentou maior sensibilidade ao extrato (72,41%), seguida por *P. mirabilis* (33,30%), *E. coli* (25%) e *Salmonella* spp. (22,72%).

Amostras de geoprópolis (composto de própolis e argila) de *Melipona scutellaris* obtidas na região de Entre Rios, no estado da Bahia, foram avaliadas quanto ao seu efeito antimicrobiano por Da Cunha et al. (2013). Foi testada a atividade antibacteriana do extrato etanólico da geoprópolis, e suas frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, em concentrações entre 3,125 a 1600 µg/mL, contra *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *S. aureus*

resistente à meticilina, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii* e *P. aeruginosa*. As bactérias mais sensíveis, tanto ao extrato quanto às suas frações, foram as cepas de *S. aureus*, apresentando concentração bactericida mínima (CBM) e concentração inibitória mínima (CIM) menores que 50 µg/mL. Já o crescimento da *P. aeruginosa* não foi inibido por nenhuma das concentrações testadas do extrato etanólico e suas frações. A fração que exerceu melhor atividade antibacteriana foi a fração hexânica do extrato etanólico, apresentando CIM entre 6,25 e 400 µg/mL e CBM entre 25 e 1600 µg/mL, exceto para *P. aeruginosa*. Além disso, o extrato etanólico, na concentração de 25 µg/mL, e sua fração hexânica, na concentração de 6,25 µg/mL, inibiram 51% e 86%, respectivamente, a formação de biofilme pelo *S. mutans*, bactéria que habita cavidade oral. A análise química do extrato etanólico e da sua fração hexânica apresentou picos similares, porém mais concentrado na fração hexânica. A análise cromatográfica indicou a presença de benzofenonas, porém não se observou a presença de flavonóides.

Righi et al. (2011) utilizaram um extrato metanólico de própolis vermelha coletada na região de Maceió, no estado de Alagoas, para avaliação da atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *E. faecalis* e *Streptococcus pyogenes*; Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*; e do fungo *Candida albicans*. O extrato inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados, havendo uma maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas ao extrato. Um extrato etanólico de própolis vermelha, obtida de um apiário de *A. mellifera* também do estado de Alagoas, e sua fração clorofórmica, foram submetidos à avaliação de sua atividade antibacteriana contra *S. aureus* por Cabral et al. (2009). Na análise cromatográfica da fração clorofórmica e do extrato etanólico foram identificados os compostos quercetina (flavonóide), formonetina e daidzeina (isoflavonas) e os ácidos fenólico e ferúlico, não havendo diferença estatística na quantidade de fenólicos totais entre ambos. A atividade contra a bactéria testada foi potencializada quando utilizada a fração clorofórmica do extrato etanólico da própolis vermelha, sendo a CBM e a CIM da fração clorofórmica 50% menor que a do extrato etanólico.

Cardoso et al. (2010) realizaram um estudo onde se avaliou o efeito de um extrato etanólico de própolis, obtida da região de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul, contra os principais agentes isolados de otite canina, *Staphylococcus coagulase-positivos* (*S. aureus* e

Staphylococcus intermedius) e *Malassezia pachydermatis*. As concentrações de própolis utilizadas para avaliar a concentração bactericida mínima (CBM) foram de 42,8 mg.mL⁻¹ à 0,69 mg.mL⁻¹. A concentração bactericida mínima encontrada neste estudo foi de 21 mg.mL⁻¹ para os agentes bacterianos estudados. Oliveira et al. (2010) testaram óleo essencial extraído de uma amostra de própolis obtida no estado do Rio de Janeiro no mês de julho. O óleo foi submetido à cromatografia gasosa e espectrometria de massa onde se observou que os componentes em maior quantidade foram β -caryophyllene (12,7%), acetophenone (12,3%) e linalool (6,47%). A atividade antibacteriana do óleo foi testada pelo método de difusão em disco contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermides*, *S. pyogenes* e *E. coli*. O óleo apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas não havendo diferença estatística entre elas.

Kujumgiev et al. (1999) também testaram o efeito antibacteriano dos extratos de própolis obtidas de diferentes localidades contra *S. aureus* e *E. coli*. As amostras somente apresentaram efeito contra a bactéria Gram positiva *S. aureus*.

Um estudo avaliando a atividade *in vitro* de extratos metanólicos, nas concentrações entre 64 e 0,25 μ g/mL, de vinte amostras de própolis de origem cubana, entre elas amostras de própolis vermelha, marrom e amarela, contra bactérias e fungos foi desenvolvido por Monzote et al. (2012). A avaliação antibacteriana foi realizada contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Todas as amostras apresentaram atividade contra o *S. aureus* nas concentrações mínimas, porém nenhum dos extratos, mesmo em altas concentrações, apresentou atividade contra a *E. coli*.

A ação antibacteriana da própolis é evidenciada principalmente sobre as bactérias Gram-positivas. Apesar de haver efeito contra as bactérias Gram-negativas, as Gram-positivas mostraram-se mais suscetíveis à própolis, sendo este fato atribuído à ação dos compostos presentes na própolis sobre a parede celular das bactérias Gram-positivas. E apesar da parede celular das bactérias Gram-negativas não ser tão rígida quanto as Gram-positivas, é quimicamente mais complexa e possui maior teor lipídico que as Gram-positivas (VARGAS et al., 2004).

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

A própolis possui também atividade antifúngica, sendo esta demonstrada em diversos estudos. Entre eles, o realizado por Fernandes et al. (2007) que avaliaram a atividade de um extrato etanólico de própolis verde contra o *Cryptococcus neoformans* e observaram o efeito inibitório do crescimento fúngico com extrato etanólico da própolis na concentração 0,2 mg.mL⁻¹.

Extrato alcoólico de própolis verde, proveniente da região de Belo Horizonte, e de própolis vermelha, proveniente da Paraíba, fornecidos pela empresa Pharma Néctar®, foram testados contra três espécies de *Trichophyton* spp. (*T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*), nas concentrações 0,03 a 1024 µg.mL⁻¹ (SIQUEIRA et al., 2009). O extrato etanólico de própolis verde apresentou concentração mínima fungicida de 1024 µg.mL⁻¹ para as espécies *T. rubrum* e *T. tonsurans*, e 512 µg.mL⁻¹ para *T. mentagrophytes*. Já a concentração mínima fungicida do extrato de própolis vermelha foi 128–256, 128–1024 e 256–512 µg.mL⁻¹ para *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*, respectivamente.

Monzote et al. (2012) também avaliaram a atividade antifúngica dos extratos metanólicos, também nas concentrações entre 64 e 0,25 µg/mL, de vinte amostras de própolis cubanas contra *T. rubrum* e *C. albicans*. Houve atividade contra o *T. rubrum* em baixas concentrações, já contra a *C. albicans* nem mesmo as mais altas concentrações testadas exerceram atividade.

Kujumgiev et al. (1999) testaram o efeito de extratos etanólicos de própolis de diversas regiões contra *C. albicans*, sendo que todas as amostras de própolis apresentaram efeito inibitório contra o agente fúngico. Cardoso et al. (2010) também avaliaram o efeito antimicrobiano da própolis contra *M. pachydermatis*, outro agente causador de otite canina. A concentração fungicida mínima encontrada neste estudo foi de 5,3 mg.mL⁻¹.

ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Gressler et al. (2012) testaram um extrato etanólico de própolis, obtida da região central do estado do Rio Grande do Sul, contra o protozoário *Trypanosoma evansi*. Foram realizados testes *in vitro* e em animais infectados experimentalmente. Avaliou-se a susceptibilidade *in vitro* de tripomastigotas à própolis nas concentrações 0, 0,5, 1, 5 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, havendo contagem dos tripanossomas restantes após 1, 3, 6, 9 e 24 horas. A concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu significativamente o número de parasitas após 1 hora, não havendo observação de parasitas vivos na concentração 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após uma hora. Para a avaliação *in vivo* foram utilizadas 36 ratas, que foram divididas em seis grupos, sendo cinco grupos submetidos à infecção por tripanossomas. Além dos controles, positivo (infectado e não tratado) e negativo (não infectado e não tratado), os demais grupos compreendiam animais tratados com doses que variaram de 100 mg.kg^{-1} a 400 mg.kg^{-1} do extrato de própolis. Não foram observados sinais de intoxicação pela própolis nos animais. No grupo que recebeu 400 mg.kg^{-1} observou-se um aumento no tempo de vida, quando comparado ao grupo controle positivo.

A atividade contra trofozoítos de *Giardia duodenalis* de um extrato hidroalcoólico de própolis, obtida de um apiário em São Paulo, foi avaliada por Freitas et al. (2006). Observou-se redução de 50% ou mais no crescimento dos parasitas nas concentrações entre 125 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, em todos os períodos de incubação (24, 48, 72 e 96 horas).

CONCLUSÃO

A própolis é um importante produto natural, conhecido popularmente por seus efeitos cicatrizante e antisséptico. A ação antimicrobiana, *in vitro*, assim como a composição de própolis obtidas de diferentes regiões vêm sendo estudada contra diversos agentes de interesse humano e veterinário. A própolis demonstrou efeito contra diversos agentes de interesse veterinário *in vitro*, sendo este efeito dose dependente. Entretanto, poucos estudos *in vivo* foram desenvolvidos, restando uma grande lacuna a ser preenchida, não somente em relação a outras espécies como também em relação a outras vias de administração.

REFERÊNCIAS

- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. et al. *In vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1999, p. 190-193, 1999.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, jan./fev. 2000.
- BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas, **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22 n. 3, p. 318-322, 2009.
- CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CARDOSO, R.L.; MABONI, F.; MACHADO, G. et al. Antimicrobial activity of propolis extract against Staphylococcus coagulase positive and Malassezia pachydermatis of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, v. 142, n. 3-4, p. 432-434, 2010.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 1, p. 1-6, 2002.
- CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAU, M. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, 2011.
- DA CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 23, 2013.
- FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L. et al. The *in vitro* antifungal activity evaluation of propolis 12g ethanol extract on cryptococcus neoformans. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 93-95, 2007.
- FISCHER, G.; DUMMER, L. A.; VIDOR, T. et al. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarreia Viral dos Bovinos. In: EnPos - Encontro de Pós-Graduação, 7, 2005, Pelotas. **Anais**, 2005.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L. et al. Immunomodulation produced by green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v. 25, p. 1250-1256, 2007.

FREITAS, S. F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J. M. et al. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, p. 170-175, 2006.

GARCIA, R. C.; SÁ, M. E. P.; LANGONI, H. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida in vitro* e em coelhos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 69-77, 2004.

GRESSLER, L. T.; SILVA, A. S.; MACHADO, G. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1314-1317, 2012.

LOGUERCIO, A. P.; GROFF, A. C. M.; PEDROZZO, A. F. et al. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacol**, v. 64, p. 235-240, 1999.

MARCUCCI, M. C. Propolis: a chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C. et al. *In vitro* antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 978-984, 2012.

OLIVEIRA, A. P.; FRANÇA, H. S.; KUSTER, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p. 121-130, 2010.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 6, p. 2363-2370, 2011.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, J. R. A.; LOPES, C. A. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 73, p. 243-249, 2000.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. ***Letters in Applied Microbiology***, v. 48, p. 90–96, 2009.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. ***Ciência Rural***, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura segura? ***Química Nova***, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. ***Química Nova***, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILELA, C. O.; FISCHER, G.; CASTRO, C. C. et al. Virucidal activity of green propolis against avipoxvirus in chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. ***African Journal of Microbiology Research***, v. 5, n. 9, p. 1075-1082, 2011.

2.2 Artigo 2

Atividade antibacteriana e antifúngica, *in vitro* e *in situ*, do extrato etanólico de própolis verde, frente a micro-organismos presentes em bebedouros avícolas

Francine B. R. de Souza^{1*}, Raulene R. Lobo¹, Luiza G. Osório², Sílvia R. L. Ladeira³, Geferson Fischer¹, Gilberto D. Vargas¹

¹ *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

² *Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

³ *Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

** Autor para correspondência: cinebsouza@yahoo.com.br*

O presente artigo será submetido à revista African Journal of Microbiology Research

RESUMO

A limpeza e desinfecção constituem importantes medidas de biossegurança adotadas em um ciclo de produção, visando manter baixas as concentrações de agentes patogênicos, reduzindo a probabilidade de infecções. Porém, as bactérias podem adquirir resistência aos desinfetantes utilizados para este fim. A própolis, produto natural produzido por abelhas a partir de plantas, possui ação antimicrobiana comprovada, mas são raros os estudos utilizando-a como desinfetante. Neste estudo, um extrato etanólico de própolis verde (EEPV) foi avaliado, em comparação a um desinfetante comercial à base de amônia quaternária, quanto à capacidade desinfetante *in situ* em bebedouros utilizados para frangos de corte até 28 dias de idade. O EEPV também foi avaliado, *in vitro* contra as bactérias isoladas a partir de suabes dos bebedouros utilizados no experimento.

Houve um aumento no número de UFC/ml de mesófilos totais e diminuição no número de UFC/ml de bolores totais presentes nos bebedouros à medida que as aves atingiram 28 dias de idade. Além disso, aos 28 dias, quando o desafio microbiano foi maior, a ação do EEPV como desinfetante foi semelhante à ação do desinfetante comercial a base de amônia quaternária. Nesta mesma idade das aves, o EEPV, assim como o desinfetante comercial, inibiu por completo o crescimento fúngico nos bebedouros.

O EEPV apresentou ação *in vitro* contra as bactérias gram positivas *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., isoladas a partir de suabe coletado dos bebedouros, além da bactéria gram negativa *Escherichia coli*.

Palavras-chave: Desinfecção. Mesófilos totais. Bolores totais. Própolis

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo e o terceiro maior produtor (12 milhões de toneladas no ano de 2012), ficando atrás da China (13 milhões) e dos Estados Unidos (16 milhões) (UBA, 2013). A cadeia produtiva da carne de frango é o setor que apresenta a maior velocidade de expansão entre os setores produtivos de carne, sendo este desenvolvimento baseado, principalmente, em boas técnicas de manejo, melhoramento genético, nutrição e controle sanitário (Godoy, 2001; Dickel, 2004).

Visando esta maior produtividade, é imprescindível a adoção de medidas de biossegurança na produção. De acordo com Spinosa et al. (2006), a desinfecção é o conjunto de medidas empregadas para impedir a entrada e crescimento de microorganismos em um ambiente ou estrutura, tornando-os livres de agentes infecciosos, com o uso de substâncias desinfetantes ou outras formas físicas de desinfecção.

Dentro do ciclo de produção, os procedimentos de limpeza e desinfecção constituem uma das etapas mais importantes, e requerem a utilização de produtos de eficácia comprovada. O processo de higienização realizado rotineiramente é indispensável para que se mantenha um alto nível de saúde do rebanho. O objetivo da limpeza e desinfecção é manter baixa a concentração de agentes patogênicos, reduzindo a probabilidade de infecções (Ourofino, 2004; Ferreira, 2008). Entre os desinfetantes mais utilizados na avicultura brasileira estão os desinfetantes à base de: formol, como o formaldeído e aldeído fórmico; amônia quaternária; fenóis; cresóis e iodados

(Rui et al., 2011). Porém um fator limitante ao uso de desinfetantes é a resistência microbiana aos mesmos (Borowsky et al., 2006).

A própolis é uma substância resinosa produzida, a partir de brotos, botões florais e exsudatos resinosos de plantas, e enriquecida com secreções enzimáticas e salivares de abelhas da espécie *Apis mellifera* (Park et al., 2002; Castaldo e Capasso, 2002). A função antimicrobiana da própolis vem sendo amplamente estudada, havendo inúmeros relatos de suas funções antimicrobianas em agentes de importância na medicina veterinária (Souza, et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação desinfetante *in situ* de um extrato etanólico de própolis verde em bebedouros pendulares utilizados na produção avícola, assim como a atuação *in vitro* da mesma, frente a bactérias isoladas a partir destes bebedouros.

MATERIAL E MÉTODOS

Extrato etanólico de própolis verde (EEPV)

A extração da própolis foi realizada segundo Paulino et. al. (2002), obtendo-se um extrato etanólico de própolis verde a 40%, sendo este armazenado a uma temperatura de 4°C.

Desinfecção dos bebedouros

O experimento foi realizado em um galpão experimental para frangos de corte do Campus CAVG do Instituto Federal Sul Rio-Grandense em Pelotas-RS. Foram utilizados nove bebedouros, tipo pendulares, para a realização do experimento. Os bebedouros foram divididos em três tratamentos, resultando em três bebedouros por

tratamento. Os tratamentos consistiam de pulverização com água (controle negativo-T1), pulverização com o extrato etanólico de própolis verde em uma concentração de 400 µg/mL (T2) e pulverização com desinfetante comercial a base de amônia quaternária (controle positivo-T3). Os tratamentos eram pulverizados em jato constante contornando toda a superfície dos bebedouros (duas vezes) totalizando 3 mL do tratamento por bebedouro. Os bebedouros foram identificados conforme tratamento ao qual seriam submetidos e distribuídos aleatoriamente no interior do galpão experimental.

Os bebedouros sofriam lavagem com água potável e esponja individual todos os dias, assim como pulverização com o tratamento indicado. Aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de vida dos pintinhos foram realizadas as cinco coletas de amostras da superfície dos bebedouros. Fazia-se a coleta de material antes da lavagem de cada bebedouro, retirando somente a água residual do mesmo. Após a lavagem e pulverização do tratamento, esperava-se dez minutos e então se realizava uma nova coleta, totalizando, no final do período experimental, 90 amostras coletadas. Logo após as amostras eram encaminhadas para realização da avaliação microbiológica.

Avaliação microbiológica

Para determinação do grau de contaminação e da eficiência da desinfecção na superfície dos bebedouros, a avaliação microbiológica baseou-se na técnica de contagem de mesófilos totais conforme metodologia padrão proposta por Silva et al. (1997).

Coletou-se inicialmente material da superfície dos bebedouros com um suabe estéril. O suabe foi colocado em tubo tipo falcon com a solução salina estéril e homogeneizado por 30 segundos. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais das amostras em solução salina e alíquotas de 0,1 mL das diferentes

diluições foram plaqueadas na superfície de placas contendo Agar Padrão de Contagem (Acumedia). As amostras dos bebedouros em salina, tanto antes quanto após a desinfecção, foram diluídas na primeira coleta em 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Pelo fato de acreditar-se que a carga microbiana iria aumentar ao longo das semanas, foram-se aumentando as diluições, até que na última semana do experimento as amostras foram diluídas em 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas quando se realizou a leitura por contagem de unidades formadoras de colônia bacteriana (UFC/mL).

Para avaliação da atividade antifúngica também foram realizadas semeaduras em superfície como descrito anteriormente, em placas contendo o Ágar Sabouraud Dextrose como meio de cultura, utilizando a amostra não diluída, e as diluições 10^{-1} e 10^{-2} em todas as coletas. As placas foram incubadas a temperatura de 25° C por cinco dias para pesquisa de fungos filamentosos, onde houve contagem de UFC fúngicas de bolores totais.

Os valores de contagem de unidade formadora de colônia (UFC) foram convertidos para logaritmo de base dez. Através do programa Statistix 9.0 foi feita a análise de variância buscando diferença estatística entre as médias de tratamento utilizando o teste LSD.

Caracterização Bacteriana

Após o crescimento no Ágar Padrão de Contagem, foram selecionadas colônias para caracterização. Foram selecionadas dez colônias, visualmente diferentes entre si, a partir das placas semeadas com os suabes coletados antes da aplicação dos tratamentos. As colônias selecionadas foram semeadas, simultaneamente, em duplicata, em Agar sangue com 5% de sangue ovino e Agar

MacConkey e incubadas a 37° C por 24 horas. A partir das colônias puras obtidas, realizou-se a coloração de Gram e caracterizaç

Susceptibilidade bacteriana *in vitro*

Após concluída a caracterização bção bioquímica bacteriana os isolados foram submetidos a avaliação *in vitro* da susceptibilidade bacteriana à própolis. Para os testes o inócuo foi preparado em solução salina estéril e ajustado na escala 1 de MacFarland. Realizou-se a contagem bacteriana a partir do inócuo, já ajustado na escala MacFarland, transferindo-se 100 µl do mesmo para placas contendo Agar padrão para contagem, e incubando-se a 37° C por 24 horas. A avaliação foi realizada em microplacas de 96 poços. Os isolados foram submetidos às seguintes concentrações do extrato etanólico de própolis verde: 40 mg/mL, 4 mg/ml e 400 µg/ml. Foram dispostos 100 µl dos isolados nas linhas 1 a 10 da placa e colunas A a C. Na linha A foram adicionados 100 µl do EEPV na concentração de 400 µg/ml, na linha B 100 µl do EEPV na concentração de 4 mg/ml e na linha C 100 µl do EEPV na concentração de 40 mg/ml. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após 15 minutos e 5 horas de incubação, 5 µl de cada poço, contendo o isolado e o EEPV, foram transferidos para uma placa de Petri contendo Agar sangue a fim de avaliar a inibição da atividade bacteriana. Após o período de incubação, 100 µl dos poços contendo os isolados bacterianos e o EEPV na concentração de 4 mg/ml foram transferidos para uma placa contendo Agar padrão para contagem, e novamente incubados a 37° C por 24 horas.

RESULTADOS

Avaliação microbiológica

A partir da coleta de suabes para avaliação microbiológica dos bebedouros observou-se, a cada semana um aumento na carga bacteriana presente na superfície dos bebedouros (Figura 1a). Já a carga de bolores totais diminuiu da coleta 1 em relação a coleta 5 (Figura 1b).

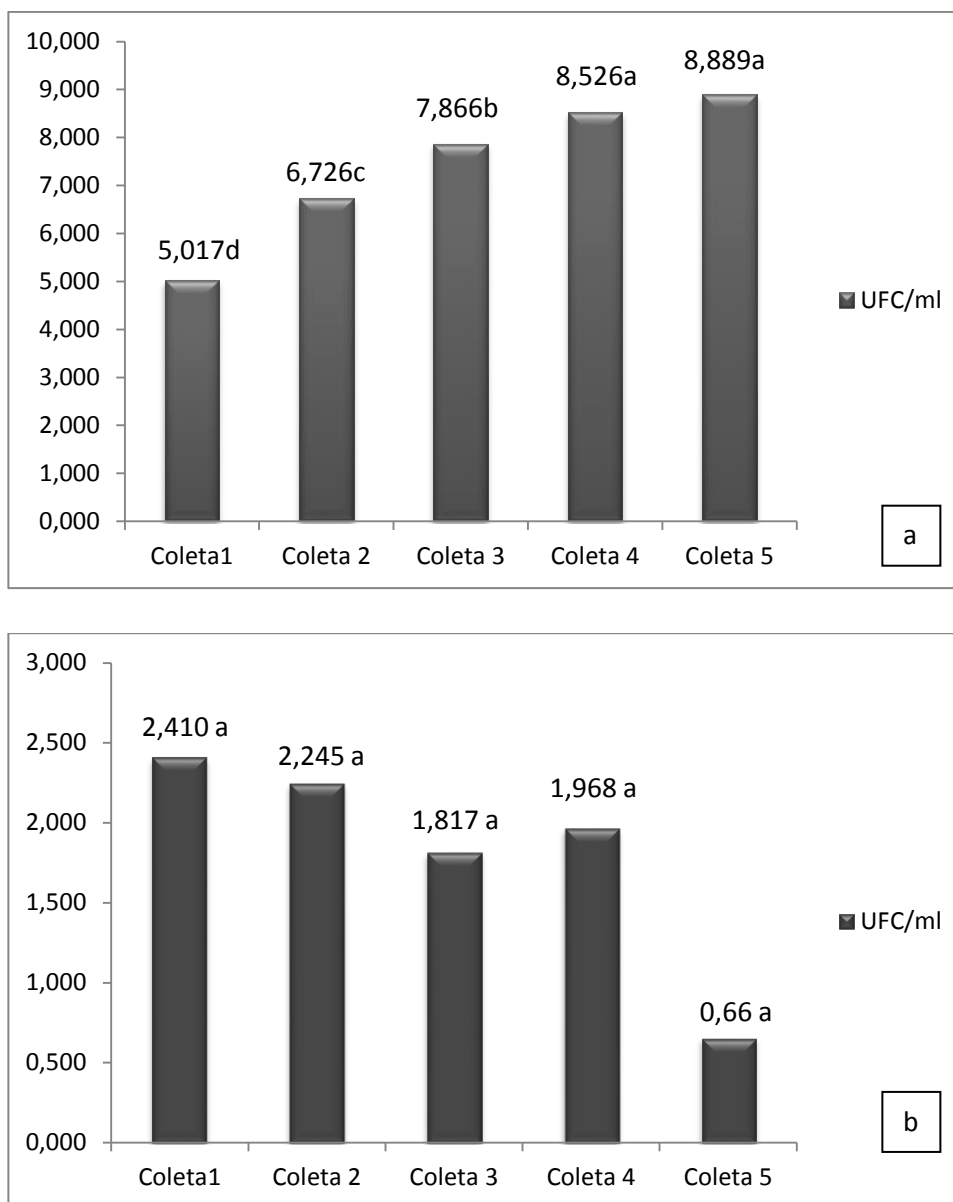


Figura 1: Representação gráfica da contagem geral, por coleta, de UFC/ml. (a) Contagem de mesófilos totais. (b) Contagem de bolores totais. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre coletas ($p < 0,05$).

Na primeira coleta não houve diferença significativa quando comparado o número de UFC/ml de mesófilos totais antes e depois da aplicação dos tratamentos, embora havendo redução no número de UFC/ml em todos os tratamentos após o processo de limpeza. Na comparação de médias entre tratamentos, após a aplicação dos mesmos, não houve diferença estatística (Fig.2a). Assim como na primeira coleta, na segunda coleta não houve diferença estatística no número de

UFC/ml, dentro de cada tratamento, antes e após a aplicação do tratamento. Já na comparação entre tratamentos não houve diferença no número de UFC/ml após a aplicação de T1 e T2, porém a utilização de amônia quaternária (T3) diminuiu significativamente, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais (Fig. 2b). Na terceira coleta houve diferença estatística no número de UFC/ml antes e após a utilização da água e própolis (T1 e T2), não havendo diferença com a utilização do desinfetante comercial (T3). Não houve diferença estatística, entre os tratamentos, após a aplicação dos tratamentos (Fig. 2c). Na quarta coleta, somente o tratamento utilizando o EEPV como desinfetante (T2) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) quanto ao número de UFC/ml antes e após a aplicação do tratamento. Entre os tratamentos não houve diferença significativa no número de UFC/ml após o processo de desinfecção (Fig. 2d). Na quinta coleta não houve diferença estatística no número de UFC/ml antes e após a aplicação dos tratamentos, dentro de cada tratamento. Já entre os tratamentos, o número de UFC/ml após a aplicação dos tratamentos utilizando o EEPV e o desinfetante comercial (T2 e T3) foram menores estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao tratamento onde se utilizou a água (T1) (Fig. 2e).

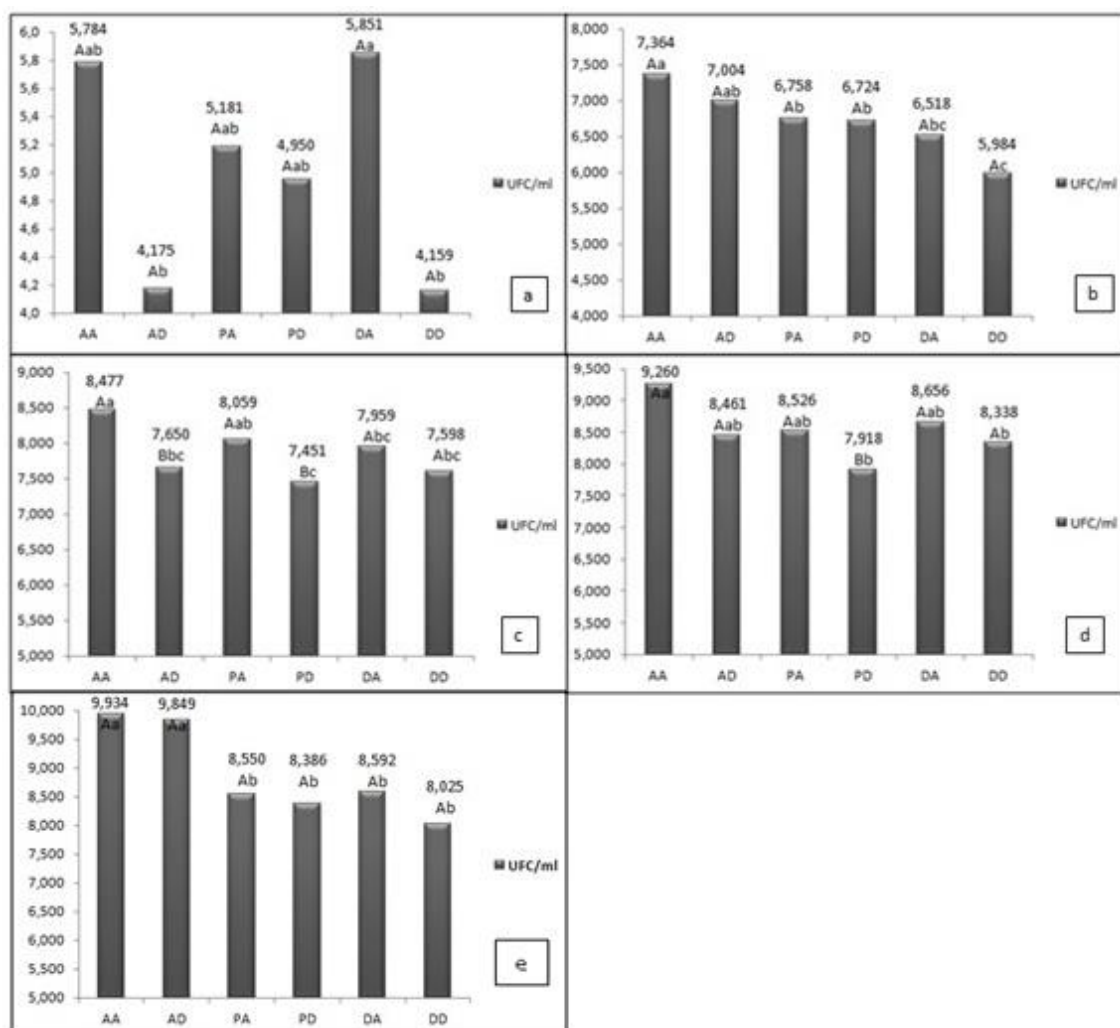


Figura 2: Representação gráfica do número de UFC/ml de mesófilos totais em cada coleta sendo AA: T1 antes aplicação do tratamento - água, AD: T1 depois aplicação do tratamento - água, PA: T2 antes aplicação do tratamento - EEPV, PD: T2 depois aplicação do tratamento - EEPV, DA: T3 antes aplicação do tratamento - amônia quaternária, DD: T3 depois aplicação do tratamento - amônia quaternária. (a) Coleta 1, (b) Coleta 2, (c) Coleta 3, (d) Coleta 4, (e) Coleta 5. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Em relação à contagem de bolores totais, na primeira coleta não houve diferença significativa no número de UFC/ml antes e após a aplicação do tratamento, dentro de cada tratamento, mesmo havendo redução no número de UFC/ml em todos os tratamentos após a aplicação do mesmo. Entre os tratamentos também não houve diferença estatística (Fig. 3a). Na segunda coleta somente o tratamento utilizando a água (T1) reduziu significativamente o número de UFC/ml após a aplicação do tratamento, já na comparação entre tratamentos não houve diferença estatística (Fig. 3b). Na terceira e quarta coletas não houve diferença estatística tanto na comparação dentro dos tratamentos antes e após a aplicação dos mesmos, quanto entre os tratamentos após a aplicação (Figs. 3c e 3d). Na quinta coleta os tratamentos utilizando o EEPV (T2) e o desinfetante comercial a base de amônia quaternária (T3) reduziram significativamente ($p<0,05$) o número de UFC/ml de bolores totais após o processo de limpeza e desinfecção. Entre os tratamentos, não houve diferença estatística no número de UFC/ml após a aplicação dos tratamentos, embora os tratamentos T2 e T3 tenham inibido por completo o crescimento fúngico (0 UFC/ml) (Fig. 3e).

Em todas as coletas é possível verificar que a carga fúngica dos bebedouros tratados com água (controle negativo – T1), anteriormente à coleta, é maior em relação aos demais tratamentos, sendo isso evidenciado principalmente na última coleta, onde há diferença significativa entre os tratamentos ($p<0,05$).

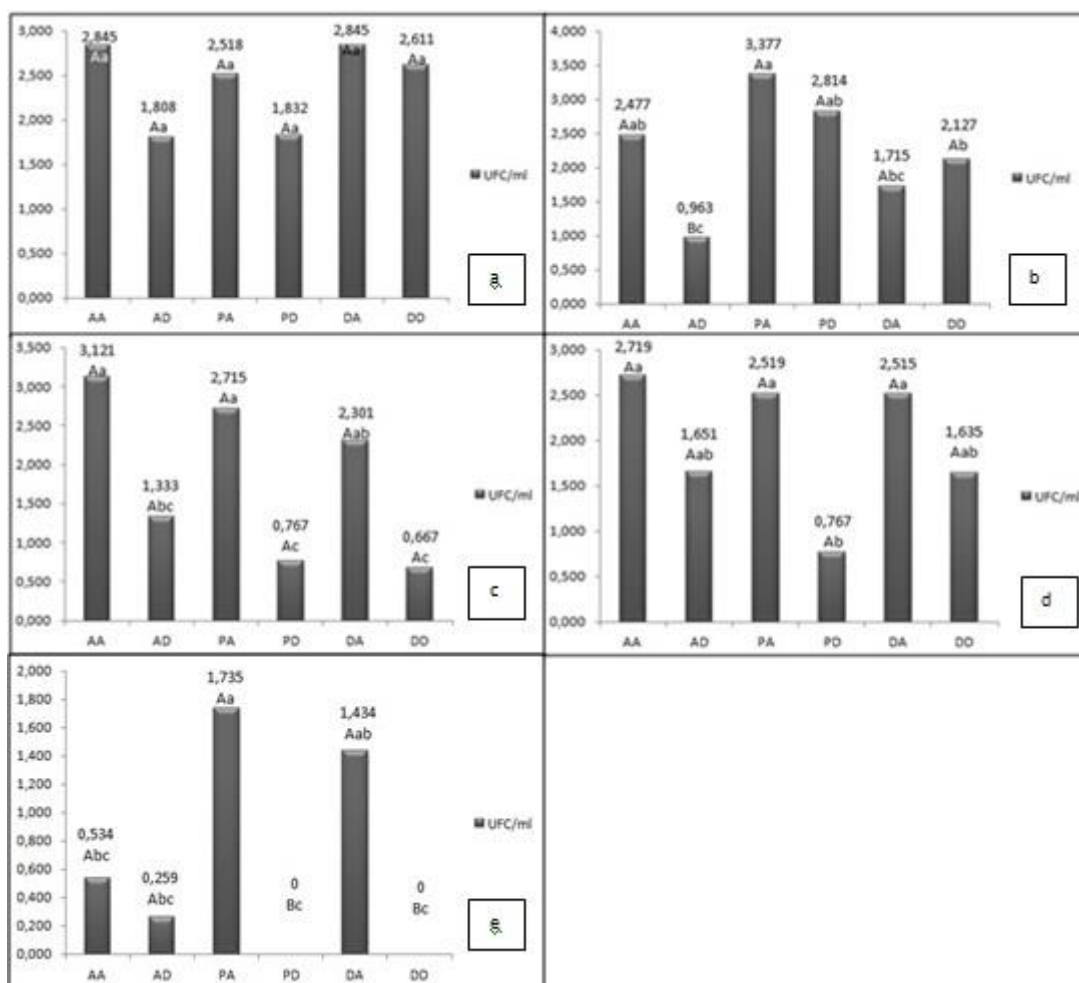


Figura 3: Representação gráfica do número de UFC/ml de bolores totais em cada coleta sendo AA: T1 antes aplicação do tratamento - água, AD: T1 depois aplicação do tratamento - água, PA: T2 antes aplicação do tratamento - EEPV, PD: T2 depois aplicação do tratamento - EEPV, DA: T3 antes aplicação do tratamento - amônia quaternária, DD: T3 depois aplicação do tratamento - amônia quaternária. (a) Coleta 1, (b) Coleta 2, (c) Coleta 3, (d) Coleta 4, (e) Coleta 5. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) dentro de cada tratamento. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Caracterização bacteriana

As bactérias isoladas a partir dos bebedouros utilizados no experimento foram as gram negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Kluyvera* spp. além de quatro cepas de *Staphylococcus aureus*, uma cepa de *Staphylococcus coagulase* negativa e uma de *Corynebacterium* sp (gram positivas).

Susceptibilidade bacteriana *in vitro*

A partir da contagem bacteriana pode-se observar redução no número de UFC/ml após as 24 horas de contato dos isolados bacterianos gram positivos com a concentração de 30 mg/ml do EEPV ($p < 0,05$). Entre os isolados bacterianos gram negativos, a *E. coli* foi a única bactéria que reduziu completamente o número de UFC/ml após as 24 horas de contato com o EEPV. As demais (*Klebsiella* sp. e *Kluyvera* spp.) não apresentaram diferença estatística no número de UFC/ml após 24 horas de contato com o EEPV em relação ao número de UFC/ml anterior à exposição ao EEPV.

DISCUSSÃO

Primeiramente é possível observar um aumento gradativo no número de UFC/ml de mesófilos totais ao longo das cinco semanas em que foram realizadas as coletas. Este fato pode ser atribuído ao aumento da pressão bacteriana no ambiente devido ao crescimento das aves e ao aumento da quantidade de excretas. Porém, ao contrário da contagem de mesófilos totais, a contagem de bolores totais diminuiu ao longo do experimento, podendo ser atribuído a necessidade de regular os bebedouros de acordo com a altura das aves, evitando o contato do mesmo com a cama. Outro fato a ser levado em consideração é o aumento do consumo de água pelas aves aumentando o fluxo de água nos bebedouros.

Pode-se observar que na quinta coleta, onde o desafio é maior devido ao alto número de UFC/ml de mesófilos totais, somente a limpeza dos bebedouros não foi suficiente para reduzir a carga bacteriana, sendo necessária a aplicação do desinfetante, seja natural (EEPV) ou químico (a base de amônia quaternária).

Percebe-se que em todas as coletas realizadas, previamente à lavagem e aplicação do tratamento, o valor de UFC/ml de mesófilos totais é maior nos bebedouros tratados somente com água, como representado na figura 2. Acredita-se que isso se deva ao fato de os tratamentos 2 e 3 exercerem poder residual. Para Kuana (2009) o poder residual é um dos fatores a serem levados em consideração na escolha do desinfetante a ser utilizado, assim como o espectro de atividade e a quantidade de matéria orgânica na superfície a ser desinfetada.

A redução no número de UFC/ml de mesófilos totais e bolores totais pode ser atribuída não somente ao tratamento aplicado, mas também a ação mecânica a que os bebedouros foram submetidos como a esponja e a água corrente utilizada para a lavagem dos mesmos.

Chernaki-Leffer et al.(2002) e Oliveira et al. (2004) também isolaram as enterobactérias *E. coli* e *Klebsiella* sp. a partir de camas de aviários e amostras fecais de frangos, respectivamente. Terzich et al. (2000) após investigação microbiológica de cama de aviários de 20 regiões dos Estados Unidos, identificou *Staphylococcus* sp. como a mais frequente, seguida pela *E. coli*. Yehia (2013) também encontrou, a partir de amostras de tratos intestinais de aves, isolados de *E. coli*, *Klebsiella* sp. e *Kluyvera* sp.,

A redução no número de UFC/ml dos isolados gram positivos após 24 horas de contato com o EEPV era esperado. Este dados convergem com os apresentados por Da Cunha et al. (2013), Cardoso et al.(2010), Loguercio et al. (2006) e Vargas et al. (2004) que obtiveram uma alta sensibilidade das bactérias gram positivas aos diferentes extratos estudados. Oliveira et al. (2010) testaram um óleo essencial extraído de própolis frente à bactérias gram positivas e à *E. coli*, e assim como neste

estudo, não obteve diferença estatística em relação à atividade antibacteriana do óleo tanto frente às gram positivas quanto frente à *E. coli* (gram negativa). No entanto, Monzote et al. (2012) avaliaram a atividade antibacteriana in vitro de um extrato etanólico de 20 amostras de própolis cubana frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, e todas as amostras apresentaram atividade contra a *S. aureus*, porém, mesmo nas concentrações mais altas testadas, não apresentaram atividade contra a *E. coli*. Righi et al. (2011) avaliaram um extrato etanólico de própolis vermelha frente a bactérias gram positivas e gram negativas, entre elas *Klebsiella pneumoniae*. O extrato inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, inclusive *Klebsiella pneumoniae*, divergindo dos dados obtidos neste estudo onde não houve inibição do crescimento do isolado de *Klebsiella* sp.

Mesmo havendo efeito contra as bactérias gram negativas, a alta susceptibilidade das bactérias gram positivas aos diferentes extratos de amostras de própolis é atribuído à ação de compostos presentes na própolis sobre a parede celular das bactérias gram positivas e a complexidade química da parede das bactérias gram negativas (Vargas et al., 2004). De acordo com Li et al. (2009) os compostos fenólicos, como os flavonoides, representam os principais componentes biologicamente ativos da própolis.

São raros os estudos avaliando a eficiência de desinfetantes com base em produtos naturais, principalmente em equipamentos utilizados na avicultura industrial, onde a limpeza e desinfecção são consideradas imprescindíveis para prevenção de infecções e um bom desenvolvimento das aves. Portanto mais estudos são necessários a fim de avaliar a capacidade de produtos naturais como desinfetantes na cadeia produtiva das aves, assim como concentração a ser utilizada, espectro de ação e poder residual.

CONCLUSÃO

Há um aumento no número de UFC/ml de mesófilos totais e diminuição no número de UFC/ml de bolores totais presentes nos bebedouros à medida que as aves atingem 28 dias de idade.

Aos 28 dias de idade dos frangos, quando o desafio microbiano é maior, a ação do EEPV como desinfetante é semelhante à ação do desinfetante comercial a base de amônia quaternária.

Nesta mesma idade, o EEPV, assim como o desinfetante comercial, inibiu por completo o crescimento fúngico nos bebedouros.

O EEPV apresentou ação *in vitro* contra as bactérias gram positivas *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., isoladas a partir de suabe coletado dos bebedouros, além da bactéria gram negativa *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

BOROWSKY, LM; BESSA, MC; CARDOSO, MI; AVANCINI, CAM. (2006) Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**. V.36, n. 5, pp. 1474-1479.

CASTALDO, S; CAPASSO, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 1, pp. 1-6.

CARDOSO, RL; MABONI, F; MACHADO, G et al. (2010) Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia* pachydermatis of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, v. 142, n. 3-4, pp. 432-434.

CHERNAKI-LEFFER, AM, BIESDORF, SM, ALMEIDA, LM, LEFFER, EVB, VIGNE, F. (2002) Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na Cama de Aviários no Oeste do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 4, n. 3, pp. 243-247.

DA CUNHA, MG; FRANCHIN, M; GALVÃO, LCC et al. (2013) Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13.

DICKEL, EL. (2004) Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FERREIRA, HC.(2008) Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.

GODOY, JC. (2001) Tendência do Mercado de Aves. **Avicultura Industrial**, Porto Feliz, 1085.

KUANA, SL.(2009) Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. DI.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. A. Doenças das aves. 2ª ed. Campinas: Facta, 1.104 p.

LI, F; AWALE, S; ZHANG, H; TEZUKA, Y; ESUMI, H; KADOTA, S. (2009) Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. **Journal of Natural Products**, v.72, n. 7, pp.1283–1287.

LOGUERCIO, AP; GROFF, ACM; PEDROZZO, AF et al. (2006) Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 2, pp. 347-349.

MONZOTE, L; CUESTA-RUBIO, O; FERNANDEZ, MC et al. (2012) In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 107, n. 8, pp. 978-984.

OLIVEIRA, WF; CARDOSO, WM; MARQUES, LCL; SALLES, RPR; FILHO, JLCA; TEIXEIRA, RSC; ROMÃO, JM; LIMA, ACP. (2004) Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 552, n. 99 pp. 211-214.

OLIVEIRA, AP; FRANÇA, HS; KUSTER, RM et al. (2010) Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, pp. 121-130.

OUROFINO Saúde Animal. (2004) Programa de limpeza e desinfecção na indústria de aves e suínos.

PARK, YK; ALENCAR, SM; SCAMPARINI, ARP et al. (2002) Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, pp. 997-1003.

PAULINO, N; SCREMIN, FM; RAICHASKI, LB; MARCUCCI, MB; SCREMIN, A; CALIXTO, JB. (2002) Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea pig trachea in vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 54, n. 6, pp. 845-852.

RIGHI, AA; ALVES, TR; NEGRI, G.(2011) et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 6, pp. 2363-2370.

RUI, BR; ANGRIMANI, DSR; CRUZ, LV; MACHADO, TL; LOPES, HC. (2011) Principais Métodos de Desinfecção e Desinfetantes Utilizados na Avicultura: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 16.

SILVA, N; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA, NFA. (1997) Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 295.

SOUZA, FBR; FISCHER, G; VARGAS, GD. (2013) Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science and animal health**. V.1, n.1, 2013.

SPINOSA, H, GORNIAC, S, BERNARDI, M. (2006) **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.35, pp. 441-447.

TERZICH, M; POPE, MJ; CHERRY, TE; HOLLINGER, J. (2000) Survey of pathogens in poultry litter in the United States. **Journal of Applied Poultry Science**. n. 9 pp. 287-291.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). Relatório Anual. 2013.

VARGAS, AC; LOGUERCIO, AP; WITT, NM et al. (2004) Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163.

YEHIA, HM. (2013) Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacteriaceae* and *non-Enterobacteriaceae* isolated from poultry intestinal. **Life Science Journal**. v. 1, n. 10, 2013.

3 Considerações finais

A própolis demonstrou ação contra diversos agentes de interesse veterinário *in vitro*, sendo este efeito dose dependente. Entretanto, poucos estudos *in vivo* foram desenvolvidos, restando uma grande lacuna a ser preenchida, não somente em relação a outras espécies como também em relação a outras vias de administração.

Ocorre um aumento no número de UFC/ml de mesófilos totais e diminuição no número de UFC/ml de bolores totais presentes nos bebedouros à medida que as aves atingem 28 dias de idade.

Quando o desafio microbiano é maior, quando as aves atingem 28 dias de idade, a ação do EEPV como desinfetante é semelhante à ação do desinfetante comercial a base de amônia quaternária. Nesta mesma idade, o EEPV, assim como o desinfetante comercial, inibiu por completo o crescimento fúngico nos bebedouros.

O EEPV apresentou ação *in vitro* contra as bactérias gram positivas *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, *S. aureus*, *Corynebacterium* sp., isoladas a partir de suabe coletado dos bebedouros, além da bactéria gram negativa *Escherichia coli*.

4 Referências

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. et al. *In vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1999, p. 190-193, 1999.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, jan./fev. 2000.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 1, p. 1-6, 2002.

CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAU, M. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, 2011.

DICKEL, E.L. Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de Salmonella em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FISCHER, G.; DUMMER, L. A.; VIDOR, T. et al. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarreia Viral dos Bovinos. In: EnPos - Encontro de Pós-Graduação, 7, 2005, Pelotas. **Anais**, 2005.

GARCIA, R. C.; SÁ, M. E. P.; LANGONI, H. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida in vitro* e em coelhos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 69-77, 2004.

GODOY, J. C. Tendência do Mercado de Aves. **Avicultura Industrial**, Porto Feliz, n. 1085, 2001.

GRESSLER, L. T.; SILVA, A. S.; MACHADO, G. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract *in vitro* and in experimentally infected rats. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1314-1317, 2012.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.1, p.147–179, 1999.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C. et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 107, n. 8, p. 978-984, 2012.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 6, p. 2363-2370, 2011.

RUSSEL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **Journal of Hospital Infection**, v.43 (suplemnt), p.S57–S68, 1998.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, J. R. A.; LOPES, C. A. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SIQUEIRA, A. B. S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 90–96, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VILELA, C. O.; FISCHER, G.; CASTRO, C. C. et al. Virucidal activity of green propolis against avipoxvirus in chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 1075-1082, 2011.

5 Apêndices

5.1 Apêndice 1

EFEITO ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS CONTRA AGENTES INFECCIOSOS DE INTERESSE VETERINÁRIO

SOUZA, Francine Bretanha Ribeiro de¹;
FISCHER, Geferson²;
VARGAS, Gilberto D'Ávila².

¹ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da UFPEL. ² Médico Veterinário, Professor Doutor da Faculdade de Veterinária da UFPEL.

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa natural, produzida por abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, que vem sendo utilizada desde a antiguidade na medicina popular, tanto humana quanto veterinária, devido as suas propriedades terapêuticas. Embora determinados mecanismos de ação não estejam totalmente esclarecidos, este produto das abelhas tem sido relacionado à ação antisséptica, cicatrizante e antipirética. A atividade antimicrobiana é relatada em diversos estudos que utilizam como modelo experimental, diferentes gêneros de vírus, bactérias, fungos e parasitas. No entanto, achados controversos em relação à atividade da própolis como agente antimicrobiano são descritos, possivelmente devido à grande variabilidade química existente entre diferentes amostras de própolis, bem como das diferentes metodologias adotadas nos estudos científicos. Este artigo teve como objetivo revisar e discutir alguns aspectos relacionados à ação antimicrobiana da própolis sobre microrganismos de interesse veterinário.

Palavras-chave: Própolis. Antimicrobiano. Veterinária.